

Перестройка структурных компонентов дермы крысы в условиях дерматотензии

Е.С. Мишина¹, М.А. Затолокина¹, М.В. Мнихович²

¹ ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава России, Курск, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Введение. Дерматотензия известна как один из эффективных способов получения материала для закрытия обширных дефектов при аллопластике и хорошо зарекомендовала себя в разных областях хирургии, косметологии и травматологии. При этом остается актуальным вопрос перестройки кожного лоскута при растяжении и возможного предела применения такого метода. В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение адаптационных перестроек волокнистого остова дермы крысы в условиях дерматотензии.

Материалы и методы. Материалом для настоящего исследования послужила кожа половозрелых крыс – самцов линии Вистар (n=30) после ее двухнедельного растяжения. Изучение кожи проводилось при помощи комплексного морфологического подхода с применением световой, электронной микроскопии, а также иммуногистохимического метода для определения типов коллагена.

Результаты. В ходе проведенного исследования выявлены выраженные реактивные изменения структурных компонентов кожи в области дерматотензии. На 14-й день от начала эксперимента наблюдались уменьшение толщины клеточных слоев эпидермиса, растяжение волокнистых структур дермы, частичная дезорганизация и их повреждение. Одновременно происходил запуск клеточных механизмов регенерации и активации коллагеногенеза, морфологическим субстратом которого стало достоверное увеличение, в 2,7 раза, численной плотности фибробластов, вырабатывающих вещества для построения волокнистых структур, 5-кратное увеличение макрофагов, являющихся катализатором функциональной деятельности фибробластов, и перераспределение типов коллагеновых волокон с преобладанием структур коллагена III типа.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перестройке прежде всего волокнистого компонента дермы, заключающейся в репаративно-восстановительных процессах, которые необходимо учитывать в клинической практике для достижения не только эстетического эффекта, но и последующего адекватного функционирования и жизнедеятельности кожного лоскута.

Ключевые слова: дерматотензия, волокнистый остов дермы, перестройка, кожа, перерастяжение

Для корреспонденции: Екатерина Сергеевна Мишина. E-mail: katusha100390@list.ru

Для цитирования: Мишина Е.С., Затолокина М.А., Мнихович М.В. Перестройка структурных компонентов дермы крысы в условиях дерматотензии. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):50–56. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.2.50-56.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 12.01.2021. Получена после рецензирования 26.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Structural dermis remodeling in a skin expansion rat model

E.S. Mishina¹, M.A. Zatolokina¹, M.V. Mnikhovich²

¹ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

² Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. Skin expansion is known to be the most effective way to obtain skin for alloplastic closing of large defects, and it has proven to be successfully used in various fields of surgery, cosmetology, and traumatology. At the same time, the issues of skin flap restructuring when it is stretched and possible range of its application are still relevant. In this regard, the aim was to study the adaptive skin rearrangements of the fibrous skeleton in a murine skin expansion model.

Materials and methods. We used the skin of mature male Wistar rats (N=30) after a 2-week stretching. We utilized a complex morphological light and electron microscopy approach as well as an immunohistochemical method to determine the types of collagen and to study the alterations in skin samples.

Results. We revealed pronounced reactive changes in the skin structural components in the skin expansion area. On day 14, we observed a decrease in the epidermal cell layer thickness as well as stretching, partial

disorganization, and damage of dermal fibrous structure. At the same time, cellular mechanisms of regeneration and activation of collagen synthesis were launched, the morphological substrate of which was (1) a significant 2.7-fold increase in the number density of fibroblasts, which produce substances for building fibrous structures, (2) a five-fold increase in macrophages, which are a catalyst for the fibroblast functional activity and (3) a collagen fiber types' redistribution with Type III collagen structures' predominance.

Conclusion. The results indicate, first of all, the restructuring of the dermal fibrous component, which implies reparative and restorative processes. These must be taken into account in clinical practice to achieve not only an esthetic effect but also the subsequent adequate functioning and vital activity of the skin flap.

Keywords: skin expansion, fibrous dermis, remodeling, skin, hyperextension

Corresponding author: Ekaterina S. Mishina. E-mail: katusha100390@list.ru

For citation: Mishina E.S., Zatolokina M.A., Mnikhovich M.V. Structural dermis remodeling in a skin expansion rat model. *Clin. exp. morphology.* 2021;10(2):50–56. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.50-56 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 12.01.2021. **Received in revised form** 26.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Использование кожи в качестве аллопластического материала получило широкое применение в лечении различных хирургических патологий. Для получения кожного лоскута основными методами являются использование аппарата Илизарова или баллонных методик [1–6]. В доступной нам литературе приведены в основном результаты, наблюдаемые в клинической практике, и отсутствуют данные о морфологических изменениях кожи в результате растяжения [7–19].

В связи с этим целью работы стало изучение адаптационной перестройки волокнистого остова дермы крысы в условиях дерматотензии.

Материалы и методы

Материалом для исследования стала кожа передней поверхности голени 30 лабораторных животных – крыс-самцов линии Вистар, которым через 5 суток после флекссионной остеоклазии берцовых костей осуществляли удлинение голени при помощи аппарата Илизарова с суточным темпом 0,5 мм за четыре приема. Животных выводили из эксперимента через 14 суток distraction. В качестве контроля исследовали кожный покров интактных животных.

Все животные находились в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утверждены постановлением главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 № 51). Уход и содержание, а также выведение животных из эксперимента осуществлялись в соответствии со стандартами, описанными директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, а также правилами, утвержденными приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Для световой микроскопии материал фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина. За-

ливку в парафин и микротомирование осуществляли по стандартным прописям. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Маллори.

Для определения типов коллагена препараты, окрашенные сириусом красным, исследовали в поляризованном свете с использованием поляризационного микроскопа Altami Polar 2 («Альтами», Россия) при $\times 100$. Оценка соотношения типов коллагена (ТК) основывалась на отличиях в цветовой гамме, характерной для каждого типа и переходных форм: I тип коллагена – красный, III тип – зеленый. Определение соотношения коллагена I и III типа осуществлялось с использованием программного комплекса Altami Studio 3.0 («Альтами», Россия) и ImageJ 1,47a (National Institute of Health, США) на основании изучения цветовой гистограммы выбранного участка в каждом поле зрения.

Толщину, численную плотность клеток дермы рассчитывали на 1 мм^2 , предварительно подсчитывая количество клеток в поле зрения микроскопа при общем $\times 440$.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) кожу фиксировали 10% забуференным нейтральным формалином, обезвоживали в замороженном состоянии в спиртах возрастающих концентраций. После спиртового обезвоживания образцов использовали метод сушки в критической точке с помощью аппарата Quorum K350 (Quorum gala instrument GmbH, Германия). Подготовленные таким образом образцы монтировали на специальный алюминиевый столик токопроводящим углеродным клеем, напыляли золотом или платинопалладиевым сплавом в напылительной установке Quorum Q150TS (Quorum gala instrument GmbH, Германия) и просматривали в сканирующем электронном микроскопе S 3400N (Hitachi, Япония).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel 2003 [2]. В связи с малой выборкой ($n=30$) в экспериментальных группах и ненормальным распределением выборки по Колмогорову–Смирнову для определения достоверности отличий средних значений применяли критерий Манна–Уитни для независимых выборок и считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в период дистракции происходит перестройка структурных компонентов кожи (рис. 1 А), проявляющаяся истончением эпидермиса и нарушением его стратификации. Толщина дермы достоверно уменьшалась по сравнению с таковой в контрольной группе в 3,3 раза (табл. 1). Интересно отметить, что волокнистые структуры делятся

на несколько типов – в верхних и нижних слоях волокна без преимущественной организации (рис. 1 В, D). Средний слой растянут параллельно направлению воздействия растягивающих сил. В сосочковом слое в основном преимущественно тонкие разветвленные коллагеновые волокна, формирующие нежные сетчатые структуры. В сетчатом слое волокна имеют больший диаметр (рис. 1 С, E). Наряду с крупными пучками

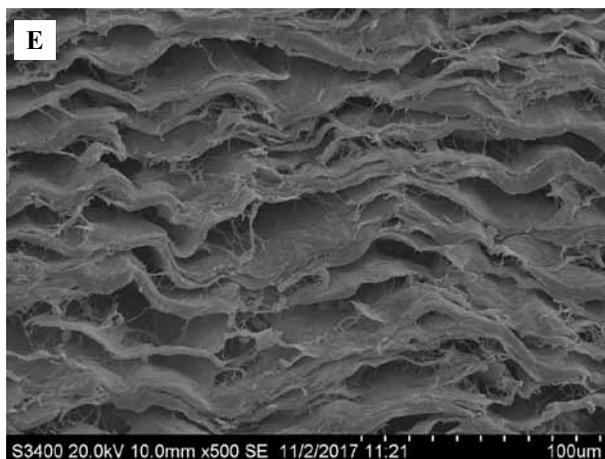
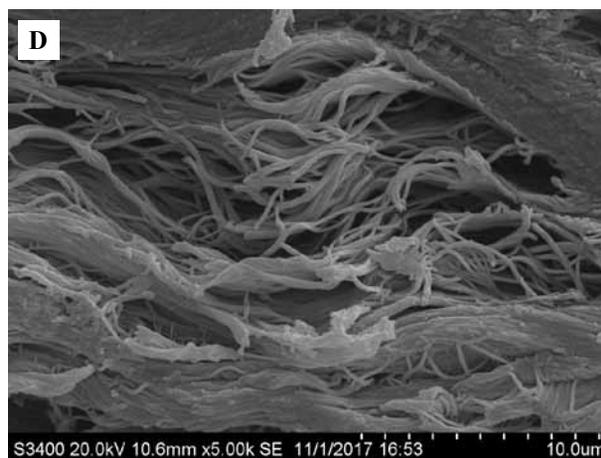
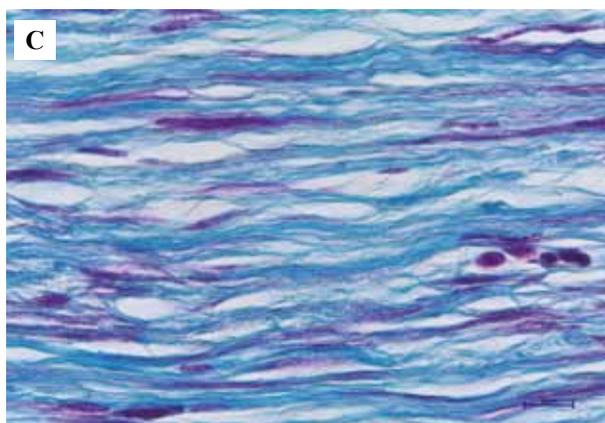
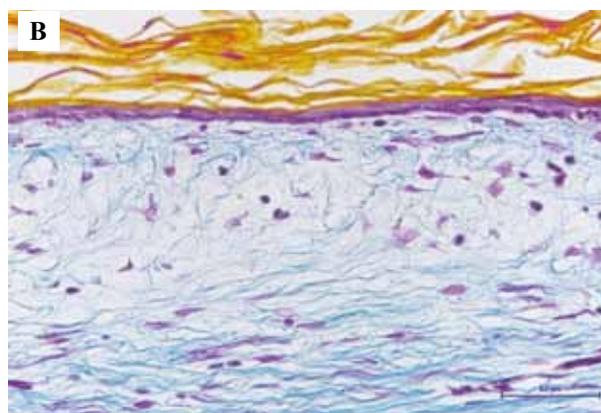
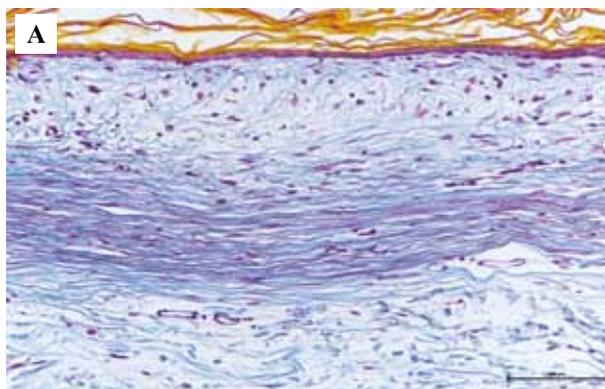


Рис. 1. Микроскопические и ультраструктурные характеристики кожи крыс экспериментальной группы. А – микрофотография кожи после дерматотензии, окраска по Маллори, $\times 100$, В – истончение эпидермиса и тонкие, рыхло расположенные волокнистые структуры в субэпидермальном слое, окраска по Маллори, $\times 400$, С – фрагмент дермы с однонаправленными волокнистыми структурами, окраска по Маллори, $\times 400$, D – сосочковый слой дермы, СЭМ, $\times 5000$, E – волокнистые структуры дермы с преимущественной анизотропией, СЭМ, $\times 500$

Fig. 1. Microscopic and ultrastructural features in the murine experimental group. A – skin microscopic image after skin expansion, Mallory staining, $\times 100$. B – thinning of the epidermis and thin, loosely located fibrous structures in the subepidermal layer. Mallory staining, $\times 400$. C – dermis with unidirectional fibrous structures. Mallory staining, $\times 400$. D – dermal papillary layer. SEM, $\times 5000$. E – dermal fibrous structures with predominant anisotropy. SEM, $\times 500$

Таблица 1 | Table 1

Количественные характеристики структурных компонентов кожи, Me (25; 75) |
Quantitative characteristics of the structural skin components, Me (25; 75)

Исследованные параметры Investigated parameters	Контроль Control	Дистракция 14 суток 14-day distraction
Толщина эпидермиса, мкм Epidermis thickness, μm	30,5 (22,8; 38,1)	12,90 (9,6; 16,1)*
Толщина дермы, мм Derma thickness, mm	2,47 (1,85; 3,05)	0,73 (0,54; 0,91)
Численная плотность клеток, на 1 мм ² дермы Cell numerical density, per 1 mm ² of the dermis		
Фibroциты Fibrocytes	37,6 (28,2; 47)	19,5 (14,62; 24,37)*
Фibroбласты Fibroblasts	15,3 (11,47; 19,12)	41,7 (31,27; 52,12)*
Макрофаги Macrophages	6,70 (5,02; 8,37)	33,0 (24,75; 41,25)*
Тучные клетки Mast cells	7,03 (5,27; 8,78)	10,23 (7,67; 12,78) *

* Статистически значимые отличия от группы контроля ($p \leq 0,05$)

* Statistically significant differences from the control group ($p \leq 0.05$)

Таблица 2 | Table 2

Распределение типов коллагена в дерме кожи, Me (25; 75) |
Collagen type distribution in the skin dermis, Me (25; 75)

Вид эксперимента Type of experiment	Площадь поля в тысячах пикселей Field area in thousand pixels	Плотность пикселей красного цвета I тип Density of Red pixel Type I	Плотность пикселей зеленого цвета III тип Density of Green pixel Type III	Соотношение коллагена I/III Collagen ratio I/III
Контроль Control	235,2 (176,4; 294)	25,1 (18,8; 31,370)	7,6 (5,7; 9,5)	3,3 (2,47; 4,12)
Дистракция Distraction	348,2 (261,15; 435,25)*	8,62 (6,46; 10,77)*	11,9 (8,92; 14,87)	0,72 (0,54; 0,9)*

* Статистически значимые отличия от группы контроля ($p \leq 0,05$)

* Statistically significant differences from the control group ($p \leq 0.05$)

волокон определялись более тонкие сетчатые структуры и микрофибрилярный компонент, обнаруживающийся вокруг фибробластов.

На границе сетчатого слоя и гиподермы наблюдалась деструкция волокнистого остова. При этом активный неоколлагенез не отмечен. В сосочковом и наружной части сетчатого слоев дермы визуализируется значительное количество сосудов микроциркуляторного русла, преимущественно капиллярного типа.

К окончанию периода дистракции в клеточном компоненте соединительной ткани дермы отмечалось достоверное ($p \leq 0,05$) повышение численной плотности фиброцитов, макрофагов и тучных клеток, количественные показатели которых представлены в таблице 1. В сосочковом слое наблюдалась активная макрофагальная реакция, менее выраженная в сетчатом слое кожи. Вблизи кровеносных сосудов микроцирку-

ляторного русла отмечены скопления тучных клеток (табл. 1).

При изучении срезов дермы кожи в поляризационном микроскопе в группе контрольных животных выявлена равномерно высокая плотность волокнистых структур, среди которых в преобладающем большинстве визуализировались коллагеновые волокна I типа (табл. 2).

В экспериментальной группе животных, в условиях дермотензии, наблюдалось значительное снижение общей плотности коллагеновых волокон с наименьшей их представленностью в поверхностных слоях дермы.

При изучении этого же фрагмента кожи в поляризационном микроскопе определялись очень слабое красное свечение и небольшое зеленое свечение, что свидетельствовало не только о снижении плотности волокон, но и об изменении соотношения типов коллагена.

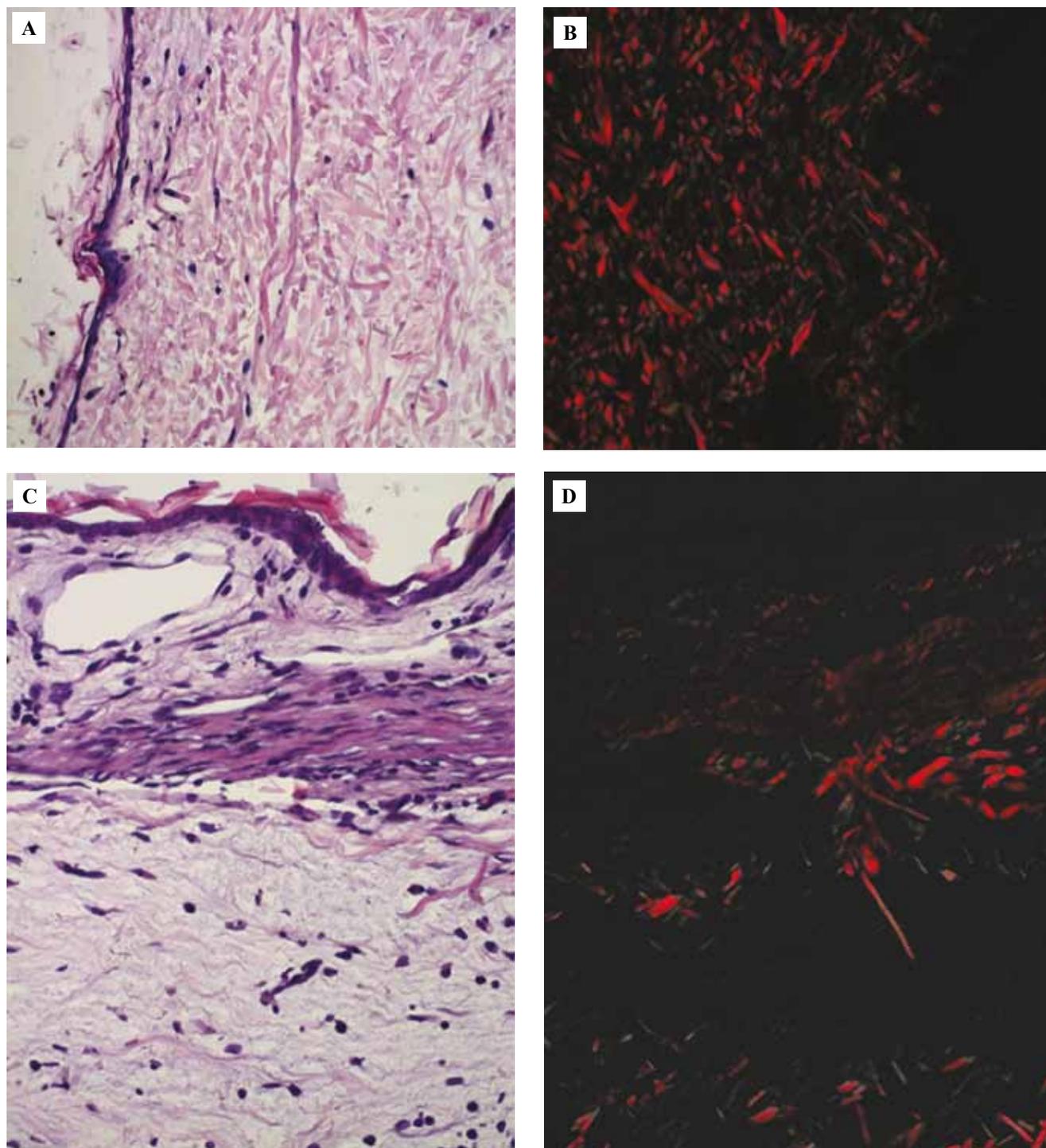


Рис. 2. Кожа крыс экспериментальной и контрольной групп при световой и поляризационной микроскопии.

- А – микрофотография кожи крыс контрольной группы, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$,
 В – коллагеновые волокна дермы кожи крыс контрольной группы, поляризационная микроскопия, $\times 100$,
 С – микрофотография кожи крыс при дистракции, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$,
 D – коллагеновые волокна дермы кожи крыс контрольной группы, поляризационная микроскопия, $\times 200$

Fig. 2. Rat skin of the experimental and control groups under light and polarizing microscopy.

- A – skin microscopic image in rats of the control group. H&E stain, $\times 100$.
 B – collagen fibers of the skin dermis in rats of the control group, polarizing microscopy, $\times 100$.
 C – microscopic image of rat skin with skin expansion, H&E stain, $\times 200$.
 D – dermal collagen fibers in rats of the control group, polarizing microscopy, $\times 200$

При анализе данных морфометрии, представленных в таблице 2, выявлено достоверное ($p \leq 0,05$) уменьшение коллагена I типа в 2,9 раза и увеличение коллагена III типа в 1,5 раза.

Выводы

Дермотензия, активно применяемая в медицинской практике, приводит к выраженным реактивным изменениям структурных компонентов кожи. В результате дистракции происходит уменьшение толщины всех слоев кожи с частичной дезорганизацией коллагеновых волокон в дерме на фоне увеличения количества клеток в зоне растяжения. Выявленное 1,5-кратное увеличение волокон, содержащих коллаген III типа, свидетельствует о неоколлагенезе и запуске процессов восстановления поврежденных волокнистых структур дермы.

Показанные морфологические и морфометрические особенности структурной организации кожи в условиях дермотензии могут служить критериями оценки фазности репаративных процессов и учитываться при разработке этапности и скорости растяжения для обоснования их внедрения в клиническую практику.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.С. Мишина, М.А. Затолокина.

Сбор и обработка материала – Е.С. Мишина, М.А. Затолокина, М.В. Мнихович.

Написание текста – Е.С. Мишина.

Редактирование – Е.С. Мишина, М.А. Затолокина, М.В. Мнихович.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.S. Mishina, M.A. Zatolokina.

Collected the data and performed the analysis – E.S. Mishina, M.A. Zatolokina, M.V. Mnikhovich.

Wrote the paper – E.S. Mishina.

Edited the manuscript – E.S. Mishina, M.A. Zatolokina, M.V. Mnikhovich.

Литература/References

1. *Chang H, Kwon ST, Chung CY, Choi IH, Ahn HT, Cho KH.* Changes in skin during distraction osteogenesis of the tibia in sprague-dawley rats: Verification of epidermal proliferation by immunohistochemical methods. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2007;41(3):97–102. DOI: 10.1080/02844310701214438.
2. *Eckes B, Krieg T.* Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22(3 Suppl 33):73–6. PMID: 15344602.
3. *Мартель И.И., Гребенюк Л.А., Долганова Т.И.* Устранение обширного мягкотканного дефекта бедра посредством дермотензии по технологии Г.А. Илизарова. *Гений ортопедии.* 2016;4:109–113. DOI: 10.18019/1028-4427-2016-4-109-113.
Martel II, Grebenyuk LA, Dolganova TI. Elimination of an extensive femoral soft-tissue defect using dermotension according to Ilizarov technology. *Genij Ortopedii.* 2016;(4):109–113 (In Russ.). DOI: 10.18019/1028-4427-2016-4-109-113.
4. *Gülses A, Sencimen M, Ayna M, Gierloff M, Açil Y.* Distraction histogenesis of the maxillofacial region. *Oral Maxillofac Surg.* 2015;19(3):221–8. DOI: 10.1007/s10006-015-0495-4.
5. *Madhuri V, Dhanraj P.* Correction of post burns contracture of wrist with Ilizarov method. *Burns.* 1998;24(6):576–8. DOI: 10.1016/s0305-4179(98)00055-2.
6. *Grebenyuk LA, Grebenyuk EB.* Express diagnosis of mechano-biological limb skin condition during prolonged dosed stretching in orthopedics. In: DG Poitout (ed.). *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics.* 2nd ed. London: Springer-Verlag, 2006. P. 241–251. DOI: 10.1007/978-1-84882-664-9.
7. *Hiraki S, Nakamura I, Okazaki H, Nakamura K, Kurokawa T.* Skin behavior during leg lengthening in patients with achondroplasia and hypochondroplasia: a short-term observation during leg lengthening. *J Orthop Sci.* 2006;11(3):267–71. DOI: 10.1007/s00776-006-1014-0.
8. *Banerjee R, Waterman B, Nelson J, Abdelfattah A.* Reconstruction of massive midfoot bone and soft tissue loss as a result of blast injury. *J Foot Ankle Surg.* 2010;49(3):301–4. DOI: 10.1053/j.jfas.2010.02.011.
9. *Omelyanenko NP, Mishina ES, Kovalev AV, Volkov AV.* Structural dynamics of the fibrous basis of reparative regenerate during spontaneous healing of the skin wound. *Bull Exp Biol Med.* 2018;166(2):274–8. DOI: 10.1007/s10517-018-4331-3.
10. *Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM.* The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Res Technol.* 2018;24(2):165–74. DOI: 10.1111/srt.12424.
11. *Engbretsen KA, Johansen JD, Kezic S, Linneberg A, Thyssen JP.* The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(2):223–49. DOI: 10.1111/jdv.13301.
12. *Kalra A, Lowe A, Al-Jumaily A.* An overview of factors affecting the skin's Young's Modulus. *J Aging Sci.* 2016;4(2):1000156. DOI: 10.4172/2329-8847.1000156.
13. *Kruglikov IL, Scherer PE.* Skin aging as a mechanical phenomenon: The main weak links. *Nutr Healthy Aging.* 2018;4(4):291–307. DOI: 10.3233/NHA-170037.
14. *Kruglikov IL, Scherer PE.* General theory of skin reinforcement. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182865. DOI: 10.1371/journal.pone.0182865.
15. *Maiti R, Gerhardt LC, Lee ZS, Byers RA, Woods D, Sanz-Herrera JA et al.* In vivo measurement of skin surface strain and sub-surface layer deformation induced by natural tissue stretching. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;62:556–69. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.05.035.
16. *Mueller MJ, Maluf KS.* Tissue adaptation to physical stress: A proposed “Physical Stress Theory” to guide physical therapist practice, education, and research. *Phys Ther.* 2002;82(4):383–403. DOI: 10.1093/ptj/82.4.383.
17. *Shah N, Cain G, Naji O, Goff J.* Skin infections in athletes: Treating the patient, protecting the team. *J Fam Pract.* 2013;62(6):284–91. PMID: 23828800.
18. *Singh B, Maibach H.* Climate and skin function: An overview. *Skin Res Technol.* 2013;19(3):207–12. DOI: 10.1111/srt.12043.
19. *Svoboda M, Bilková Z, Muthný T.* Could tight junctions regulate the barrier function of the aged skin? *J Dermatol Sci.* 2016;81(3):147–52. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.11.009.

Информация об авторах

Екатерина Сергеевна Мишина – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии Курского государственного медицинского университета.

Мария Алексеевна Затолокина – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии Курского государственного медицинского университета.

Максим Валерьевич Мнихович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека.

Author information

Ekaterina S. Mishina – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Histology, Embryology, and Cytology, Kursk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-3835-0594>

Maria A. Zatolokina – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Histology, Embryology, and Cytology, Kursk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

Maksim V. Mnikhovich – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Central Pathology Laboratory, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0001-7147-7912>